

**LAPORAN PENELITIAN KOMPETITIF DOSEN  
TAHUN ANGGARAN 2016**

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER KOMBINASI EKSTRAK BENALU  
BELIMBING (*Macrosolen cochinchensis*) DAN BAWANG SABRANG (*Eleutherine  
bulbosa* (Mill.) Urb.) PADA SEL KANKER SERVIKS (SEL HeLa)**

Nomor DIPA	:	DIPA BLU: DIPA-025.04.2.423812/2016
Tanggal	:	7 Desember 2015
Satker	:	(423812) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Kode Kegiatan	:	(2132) Peningkatan Akses, Mutu, Kesejahteraan dan Subsidi Pendidikan Tinggi Islam
Kode Sub Kegiatan	:	(008) Penelitian Yang Bermutu
Kegiatan	:	(004) Dukungan Operasional penyelenggaraan Pendidikan

**Oleh:**

**Drg. Anik listyana M.Biomed                      (19800805 200912 2001)**

**Drg. Arief Suryadinata                              (198507202009121003)**



**KEMENTERIAN AGAMA  
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
(LP2M)  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2016**

## **HALAMAN PENGESAHAN**

Laporan penelitian ini disahkan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada  
Masyarakat Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Pada tanggal 9 Oktober 2016

Peneliti

Ketua : **Drg. Anik listyana M.Biomed**  
**NIP. 19800805 200912 2001**

.....  
Anggota : **Drg. Arief Suryadinata**  
**NIP. 198507202009121003**

.....

**KETUA LP2M**

**UIN Maulana Malik Ibrahim Malang**

**Dr. Hj.Mufidah Ch., M.Ag**  
**NIP. 196009101989032001**

## **PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN**

Kami yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Drg. Anik listyana M.Biomed  
NIP : 19800805 200912 2001  
Pangkat/Gol.Ruang : Lektor/IIIc  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Biologi  
Jabatan dalam penelitian : Ketua Peneliti

Nama : Drg. Arief Suryadinata  
NIPT : 198507202009121003  
Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIIb  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan Dalam Penelitian : Anggota Peneliti

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis disebutkan dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila dikemudian hari ternyata dalam penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan dan pelanggaran etika akademik, maka kami bersedia mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima dan diproses sesuai aturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang 13 September 2016

**Ketua peneliti**

Materai 6000

Drg. Anik listyana M.Biomed  
NIP. 19800805 200912 2001

**Anggota Peneliti**

Drg. Arief Suryadinata  
NIP. 198507202009121003

## **PERNYATAAN KESANGGUPAN MENYELESAIKAN PENELITIAN**

**Kami yang bertanda tangan di bawah ini:**

Nama : Drg. Anik listyana M.Biomed  
NIP : 19800805 200912 2001  
Pangkat/Gol.Ruang : Lektor/IIIc  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Biologi  
Jabatan dalam penelitian : Ketua Peneliti

Nama : Drg. Arief Suryadinata  
NIPT : 198507202009121003  
Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIIb  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan Dalam Penelitian : Anggota Peneliti

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Kami sanggup menyelesaikan dan menyerahkan laporan hasil penelitian sesuai dengan batas waktu yang telah ditetapkan (20 Desember 2016)
2. Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan kami belum menyerahkan laporan hasil, maka kami sanggup mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima

Malang 13 September 2016

**Ketua peneliti**

Materai 6000

Drg. Anik listyana M.Biomed  
NIP. 19800805 200912 2001

**Anggota Peneliti**

Drg. Arief Suryadinata  
NIP. 198507202009121003

## **PERNYATAAN TIDAK SEDANG TUGAS BELAJAR**

**Kami yang bertanda tangan di bawah ini:**

Nama : Drg. Anik listyana M.Biomed  
NIP : 19800805 200912 2001  
Pangkat/Gol.Ruang : Lektor/IIIc  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Biologi  
Jabatan dalam penelitian : Ketua Peneliti

Nama : Drg. Arief Suryadinata  
NIPT : 198507202009121003  
Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIIb  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan Dalam Penelitian : Anggota Peneliti

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Kami TIDAK SEDANG TUGAS BELAJAR
  2. Apabila di kemudian hari terbukti bahwa saya sedang tugas belajar, maka secara langsung saya akan mengembalikan dana yang telah saya terima dari Program Penelitian Dosen tahun 2016
- Demikian surat pernyataan ini saya buat sebagaimana mestinya

Malang 13 September 2016

**Ketua peneliti**

Materai 6000

Drg. Anik listyana M.Biomed  
NIP. 19800805 200912 2001

**Anggota Peneliti**

Drg. Arief Suryadinata  
NIP. 198507202009121003

## ABSTRAK

Berdasarkan data empiris diketahui bahwa kombinasi bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*) dapat membantu penyembuhan pasien kanker dan sudah terbukti banyak yang tertolong dengan ramuan ini. Oleh karena itu penting dilakukan pembuktian secara ilmiah tentang potensi kombinasi tersebut sebagai obat antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efikasi kombinasi ekstrak etanolik bawang sabrang dan benalu belimbing dalam menghambat pertumbuhan sel kanker serviks HeLa dibandingkan dengan pemberian monoterapi serta untuk mengetahui mekanisme induksi apoptosis. Metode yang digunakan untuk mengetahui efikasi kombinasi antikanker adalah metode MTT, sedangkan untuk mengetahui mekanisme induksi apoptosis digunakan metode double staining acridine orange dan flowcytometry. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini adalah (1) ekstrak etanolik dari tanaman bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) mampu menghambat secara selektif pertumbuhan sel kanker serviks HeLa dengan nilai pada  $IC_{50}$  : 40.36  $\mu\text{g/ml}$ , nilai SI (**selectivity Index**) sebesar 4.06. (2) ekstrak etanolik dari tanaman benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*) mampu menghambat secara selektif pertumbuhan sel kanker serviks HeLa  $IC_{50}$  : 217.72  $\mu\text{g/ml}$ , nilai (**selectivity Index**) sebesar 5.77. (3) kombinasi ekstrak etanolik bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker serviks HeLa memberikan efek **sinergis sangat kuat** pada dosis EBS 22.62  $\mu\text{g/ml}$  : EBB 23  $\mu\text{g/ml}$ . **Sinergis kuat** : EBB 23  $\mu\text{g/ml}$  : EBS 11.31  $\mu\text{g/ml}$  ; EBB 23  $\mu\text{g/ml}$  : EBS 16.96  $\mu\text{g/ml}$ . **Sinergis** : EBB 23  $\mu\text{g/ml}$  : EBS 5.65  $\mu\text{g/ml}$  ; EBB 93.2  $\mu\text{g/ml}$  ; EBS 11.31  $\mu\text{g/ml}$ . (4) profil Kromatografi Lapis Tipis dengan menggunakan scanner menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat pada ekstrak adalah senyawa terpenoid, alkaloid dan flavonoid.

Kata Kunci : bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*), benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*), anticancer, sel kanker Servix HeLa

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia. Berdasarkan data WHO tahun 2012, sekitar 8,2 juta penduduk dunia meninggal karena menderita kanker dan hal ini diprediksikan akan meningkat sekitar 70% selama 2 dekade. Kanker serviks merupakan jenis kanker yang berkontribusi besar terhadap angka kematian pasien kanker, khususnya pasien wanita (Bray *et al*, 2012). Jenis kanker ini merupakan kanker terbanyak kedua wanita dengan perkiraan 445000 kasus baru pada tahun 2012 atau sekitar 84% dari kasus baru di seluruh dunia (WHO, 2012). Kanker serviks tersebut disebabkan oleh infeksi yang ditularkan secara seksual dengan jenis virus tertentu HPV (*Human Papiloma Virus*).

Pengobatan kanker yang umum dilakukan adalah pembedahan, radioterapi dan kemoterapi, namun belum didapatkan hasil yang optimal dari ketiga jenis terapi tersebut. Masing-masing dari terapi tersebut memiliki beberapa efek samping yang cenderung membahayakan pasien. Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker tersebut, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi. Fenomena resistensi tersebut membawa konsekuensi pada semakin meningkatnya dosis terapi (Conze *et al*, 2001). Hal tersebut dapat disebut sebagai fenomena *multi drug resistance* (MDR) yang dapat meningkatkan tingkat toksisitas obat yang digunakan untuk terapi (Moitra, 2015).

Ko-kemoterapi merupakan salah satu solusi terhadap fenomena MDR tersebut. Ko-kemoterapi merupakan terapi yang mengkombinasikan senyawa fitokimia dari bahan alam dengan agen kemoterapi, sehingga akan meningkatkan efikasi dan menurunkan toksisitas kemoterapi terhadap jaringan normal (Sharma *et al*, 2004; Tyagi *et al.*, 2004). Dengan adanya ko-kemoterapi ini, pengobatan dengan cara kemoterapi dapat diturunkan efek samping maupun tingkat

toksistasnya. Karena pada umumnya kemoterapi dilaksanakan dengan pengonsumsi beberapa jenis obat antikanker secara bersama yang dapat menimbulkan efek samping maupun timbul resistensi sampai menimbulkan toksistas pada penderita.

*Eleutherine bulbosa* atau sering disebut sebagai bawang sabrang merupakan tanaman yang berpotensi sebagai agen antikanker untuk ko-kemoterapi. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa ekstrak dari senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan kanker melalui inhibisi siklus pertumbuhan sel dan induksi apoptotik sel. Penelitian yang dilakukan oleh Fitri *et al* (2014) membuktikan bahwa fraksi etanol dan fraksi etil asetat bawang sabrang mampu menghambat siklus sel pada fase G1-G2 sebesar 40,88%. Penelitian ini dilakukan dengan mengambil ekstrak dari bawang sabrang dengan berbagai jenis pelarut yang kemudian di uji aktivitas antikankernya dengan metode MTT dan metode *flowcytometry*. Serupa dengan hal itu, Yusni (2008) juga mengungkapkan bahwa fraksi etanolik bawang sabrang mampu menekan pertumbuhan kanker kolon HT29 dengan ekspresi mutan p53. Pembuktian itu dilakukan dengan mengambil fraksi etanolik bawang sabrang dan dikombinasikan dengan 5-FU yang kemudian distarvasi pada sel kanker kolon. Hasil dari langkah tersebut adalah didapat LC50 yang kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia.

Tidak jauh berbeda dengan bawang sabrang, benalu belimbing dengan nama ilmiah *Macrosolen cochinchinensis* juga berpotensi sebagai agen antikanker untuk ko-kemoterapi. Benalu belimbing adalah tanaman asli Indonesia yang hanya tumbuh di daerah Kalimantan. Data empiris menunjukkan bahwa tanaman ini selama bertahun-tahun telah dimanfaatkan oleh masyarakat kalimantan sebagai obat kanker. Rahman *et al* (2012) menyatakan bahwa ekstrak daun benalu belimbing bersifat antioksidan yang dibuktikan dengan uji *DPPH free radical scavenging activity*. Hal ini mengindikasikan adanya potensi bahwa tanaman ini dapat dikembangkan sebagai agen antikanker. Hal tersebut ditunjang oleh hasil uji antikanker *in vitro* (Artanti *et al*, 2003), menunjukkan bahwa ekstrak air benalu belimbing mempunyai IC50 = 0,63 ppm terhadap sel kanker payudara MCF7; uji antikanker *in vitro* juga telah dilakukan pada sel kanker L1210 (IC50 = 41,0 ppm), HCT116 (IC50 > 20 ppm), dan A431 (IC50 > 20 ppm).



Berdasarkan data empiris diketahui bahwa kombinasi bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa* dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*) dapat membantu penyembuhan pasien kanker dan sudah terbukti banyak yang tertolong dengan ramuan ini. Oleh karena itu penting dilakukan pembuktian secara ilmiah tentang potensi kombinasi tersebut sebagai obat antikanker. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pengembangan penelitian bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa* dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*) sebagai agen *anti kanker*. Penelitian ini diharapkan dapat mengungkap potensi sinergistik ekstrak bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa* dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*). Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antikanker pada sel kanker serviks HeLa. Selain itu untuk mengetahui selektifitasnya terhadap sel normal maka pada penelitian ini, ekstrak juga diujikan pada sel normal dengan menggunakan sel Vero. Sehingga dari penelitian akan dihasilkan data aktifitas ekstrak terhadap sel kanker HeLa dan Sel normal, serta data kombinasi terapi dan mekanisme kerja.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan penelitian :

1. Apakah ekstrak etanolik dari tanaman bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) mampu menghambat secara selektif pertumbuhan sel kanker serviks HeLa ?
2. Apakah ekstrak etanolik dari tanaman benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*) mampu menghambat secara selektif pertumbuhan sel kanker serviks HeLa?
3. Bagaimana efikasi kombinasi ekstrak etanolik bawang sabrang(*Eleutherine bulbosa*) dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker serviks HeLa dibandingkan dengan pemberian monoterapi.
4. Bagaimana mekanisme kerja bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinensis*) sebagai agen *co-chemotherapy* terhadap induksi apoptosis sel kanker HeLa.

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui Apakah ekstrak etanolik dari tanaman bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) mampu menghambat secara selektif pertumbuhan sel kanker serviks HeLa ?
2. Untuk mengetahui Apakah ekstrak etanolik dari tanaman benalu belimbing (*Macrosolen cochinchensis*) mampu menghambat secara selektif pertumbuhan sel kanker serviks HeLa?
3. Untuk mengetahui Bagaimana efikasi kombinasi ekstrak etanolik bawang sabrang(*Eleutherine bulbosa*) dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinchensis*) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker serviks Hela dibandingkan dengan pemberian monoterapi.
4. Untuk mengetahui Bagaimana mekanisme kerja bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinchensis*) sebagai agen *co-chemotherapy* terhadap induksi apoptosis sel kanker HeLa.

### 1.4 Urgensi Penelitian

Penggunaan kombinasi obat kemoterapi menunjukkan beberapa efek samping yang membahayakan pada pasien, salah satunya MDR (*multi drug resistance*) yang dapat berujung pada kematian pasien (Zhi *et al*, 2013). Salah satu pengembangan cara pengobatan baru bagi kanker adalah pengobatan dengan ko-kemoterapi. Tanaman bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) dan tanaman benalu belimbing (*Macrosolen cochinchensis*) berpotensi sebagai agen ko-kemoterapi dengan beberapa penelitian yang membenarkan bahwa ekstrak dari bawang sabrang maupun benalu belimbing dapat menghambat siklus sel kanker (Fitri *et al*, 2014; Artanti *et al*, 2003). Oleh karena itu, dengan diadakannya penelitian lanjutan mengenai uji aktivitas ko-kemoterapi ekstrak bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinchensis*) pada sel kanker serviks HeLa dapat membantu memecahkan persoalan toksisitas akibat penggunaan kombinasi obat kemoterapi.

## BAB II

### STUDI PUSTAKA DAN *ROADMAP*

#### 2.1 Studi Pustaka

##### 2.1.1 Tinjauan tentang tanaman bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*)

###### 1. Klasifikasi tanaman

klasifikasi dari tanaman bawang sabrang adalah sebagai berikut

(Tjitrosoepomo, 2007) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Ordo	: Liliales
Famili	: Iridaceae
Genus	: Eleutherine
Spesies	: <i>Eleutherine bulbosa</i> (L.) Merr



(A)



(B)



(C)

Gambar 2.1 gambar tanaman *Eleutherine bulbosa*; batang (A), umbi (B), bunga (C)

###### 2. Nama daerah

Nama daerah dari tumbuhan bawang sabrang adalah bawang dayak, bawang hantu (Kalimantan Tengah) (Galingging, 2009), bawang kapal (Sumatera),

brambang sabrang, luluwan sapi, teki sabrang, bebawangan beureum, bawang siem (Jawa) ( Depkes, 1985).

### 3. Kandungan senyawa dan bioaktivitas

Bawang sabrang mengandung senyawa-senyawa yang meliputi alkaloid, glikosida, flavonoid, fenolik, triterpenoid/steroid dan antrakuinon (Galingging, 2009; Ifesan, et al., 2009). Hasil peneltian menunjukkan bahwa umbi batang bawang sabrang mengandung naphtoquinones, dan turunanya seperti elecacine, eleutherine, eleutherol, eleuthernone (Alia mustika, 2011). Dalam umbi bawang sabrang terkandung senyawa fitokomia yakni alkaloid , glikosida, flavonoid, fenolik, steorid, dan tanin. Senyawa empirik bawang sabrang telah digunkan oleh masyarakat lokal sebagai obat segala penyakit seperti kanker payudara, penurunan tekanan darah tinggi, penyakit kencing manis, menurunkan kolesterol, obat bisul, kanker usus, mecegah stroke dan mengurangi rasa sakit setelah melahirkan. Selain itu umbi bawabg sabrang juga bisa digunakan sebagai pelancar air susu ( Galingging, 2009)

Naphtoquinones dikenal sebagai antimikroba, antifungal, antivirial dan antiparasitik. Selain itu naphtoquinones juga memiliki bioaktivitas sebagai antikanker dan antioksidan yang biasanya terdapat didalam sel vakuola dalam bentuk glikosia ( Hara H dkk, 1997).Umbi bawang sabrang banyak mengandung senyawa-senyawa turunan anthrakuinon yang mempunyai daya pencahar, yaitu senyawa-senyawa eleutheurin, isoeleutheurin dan senyawa-senyawa sejenisnya , senyawa-senyawa lakton yang disebut eleutherol dan senyawa turunan phyron yang disebut eleutherinol. Adapun senyawa bioaktif yang terdapat dalam umbi bawang sabrang terdiri dari senyawa alkaloid, steroid, glukosa, flavonoid, fenolik, saponin, terpenoid, tanin dan kuinon ( Firdaus R, 2006 ).

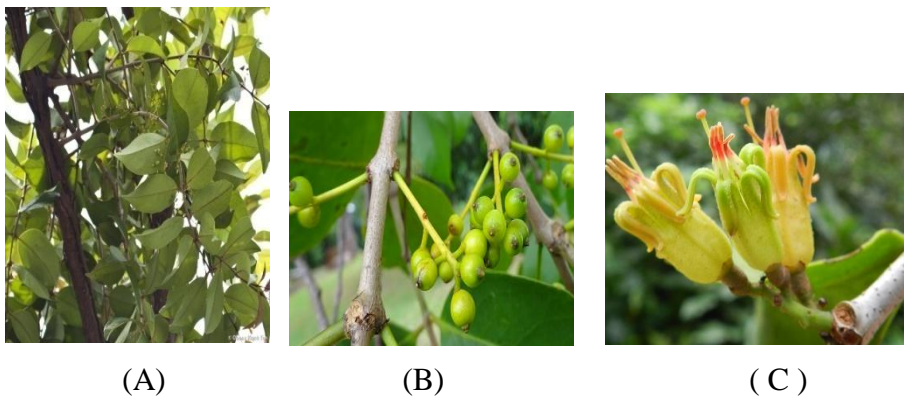
#### **2.1.2 Tinjauan tanaman benalu belimbing (*Macrosolen cochinchensis*)**

##### **1. Klasifikasi Tanaman**

Klasifikasi dari tanaman bawang sabrang adalah sebagai berikut (van Steenis, 1975) :

kingdom : Plantae

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Loranthales
Famili	: Loranthaceae
Genus	: <i>Macrosolen</i>
Spesies	: <i>Macrosolen cochinchinensis</i> (Lour.) van Tiegh.



Gambar 2.1 gambar tanaman *Macrosolen cochinchinensis*; batang (A), buah (B), bunga (C)

## 2. Nama daerah

Nama Lokal Benalu adalah Kepasilan, dalu-dalu (Sumatera), kemladehan (Jawa Tengah) (Galingging, 2009).

## 3. Kandungan senyawa dan bioaktivitas

Daun dan batang benalu mengandung alkaloida, saponin, flavonoid dan tanin (Anonim, 1999). Benalu dari spesies *Dendrophthoe* mengandung glikosida kuersetin (Hargono, 1995). Herba benalu berkhasiat anti radang, anti bakteri dan anti bengkak (Anonim, 1999). Penelitian lain menyebutkan bahwa benalu memiliki kegunaan sebagai obat batuk, diuretik, pemeliharaan kesehatan ibu pasca persalinan, penghilang rasa nyeri, luka atau infeksi kapang (Hargono, 1995). Fraksi air dan fraksi etil asetat dari daun benalu yang tumbuh pada petai mampu melarutkan batu ginjal kalsium secara *in vitro* (Sasmito *et al.*, 2001).

Pemakaian benalu bersama beberapa bahan lain juga berkhasiat dalam pengobatan kanker, amandel dan penyakit campak (Thomas, 1999).

### 2.1.3 Tinjauan tentang apoptosis sel

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram. Apoptosis merupakan proses normal yang mempunyai dua fungsi yaitu: perbaikan jaringan dan pelepasan sel yang rusak yang bisa membahayakan tubuh (King, 2000). Apoptosis dipengaruhi oleh proses fisiologis yang berfungsi untuk mengeliminasi sel yang tidak diinginkan atau tidak berguna selama proses pertumbuhan sel dan proses biologis normal lainnya (Wyllie *et al.*, 2000).

Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis yaitu berupa pengkerutan sel, kerusakan membran plasma dan kondensasi kromatin. Sel yang mati dengan proses ini tidak kehilangan kandungan internal sel dan tidak menimbulkan respon inflamasi. Jika program apoptosis sudah selesai, sel akan menjadi kepingan-kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis (*apoptotic body*). Badan apoptosis ini akan segera dikenali oleh sel makrofag, untuk selanjutnya dimakan (*engulfed*) (Wyllie *et al.*, 2000).

Pada prinsipnya ada dua jalur inisiasi apoptosis, yaitu melalui *death receptor* pada permukaan sel (jalur ekstrinsik) dan melalui mitokondria (jalur intrinsik) (gambar 2.5). Pada kedua jalur ini terjadi aktivasi *cystein aspartyl-specific proteases (caspase)*, yang berperan memecah substrat seluler sehingga akan menyebabkan perubahan morfologi dan biokimia sel sebagai karakteristik apoptosis (Igney and Krammer, 2002).

Jalur apoptosis yang disebabkan karena faktor ekstrinsik adalah melalui *death receptor* yang terdapat pada permukaan membran sel diantaranya TNF, CD95(Fas), TNF *related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) reseptor. Reseptor ini merupakan suatu protein trans membran yang memiliki tempat ikatan (domain) ligan pada sisi luar membrane plasma. Domain ini bertanggung jawab dalam transmisi *death signal* dari permukaan sel ke dalam sel. Aktivasi CD95 dan TNF reseptor menyebabkan aktivasi *caspase* 8, yang selanjutnya memicu aktivasi *caspase* 3. Aktivasi *caspase* tersebut akan memicu kerusakan mitokondria (Hengartner, 2000)

Apoptosis melalui jalur intrinsik (mitokondria) diaktivasi oleh berbagai stimuli diantaranya radiasi, radikal bebas, infeksi virus, kemoterapi dan faktor pertumbuhan. Awalnya stimuli tersebut akan memicu perubahan permeabilitas membran mitokondria yang menyebabkan terbukanya MPT (*mitochondrial permeability transition*). Sebagai konsekuensi utama dari perubahan tersebut adalah hilangnya potensial mitokondria trans membran, pengeluaran protein proapoptosis dan hilangnya fungsi organel. Secara garis besar protein tersebut dibagi menjadi dua kategori. Kategori pertama adalah protein yang mengaktifkan jalur caspase. Protein yang termasuk dalam kelompok ini adalah sitokrom (*cyt c*) dan Smac/DIABLO (*second mitochondria derived of caspase*). Cyt c membentuk kompleks dengan Apaf-1 untuk mengaktifkan caspase-9. Kompleks cyt c, Apaf-1, caspase-9 ini adalah bentuk aktif (apoptosom) yang selanjutnya mengaktifkan caspase 3 dan 7 sehingga menghasilkan pembongkaran sel melalui fragmentasi inti. Smac/DIABLO berikatan dengan IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) untuk deaktivasi dan mencegah IAPs menahan proses apoptosis. Over ekspresi Bcl-2 dan familinya seperti Bcl-Xl mengblok terjadinya apoptosis pada sel kanker (Indran *et al.*, 2011).

Kelompok protein pro-apoptosis yang kedua adalah protein *Apoptotic Inducing factor* (AIF) dan *endonuclease G* (Endo G). pada beberapa model, pengeluaran protein ini adalah terlambat pada proses apoptosis, dimana protein ini muncul ketika sel akan mati. AIF diekresikan dan masuk ke inti sel untuk selanjutnya memicu fragmentasi DNA. Aktivitas kedua protein ini (AIF dan Endo G) dalam proses *Cell death* tidak tergantung pada *caspase*.

Apoptosis melalui jalur mitokondria yang lain dimediasi Bcl-2 famili. Regulasi apoptosis ini dijalankan oleh protein yang bersifat antiapoptosis (Bcl-1 dan Bcl-xl) dan pro-apoptotic (Bax dan Bak). Protein-protein tersebut berperan dalam regulasi apoptosis melalui pengaturan pelepasan *cyt-c*. Ekspresi Bcl-2 atau Bcl-xl mencegah pelepasan *cyt-c* dari mitokondria. Penambahan langsung Bax pada isolat mitokondria dapat menginduksi pelepasan *Cyt-c* (Igney dan krammer, 2002). Di dalam sitosol *Cyt c* akan membentuk kompleks dengan apaf-1 (*Apoptotic Protease Factor-1*), ATP dan *procaspase-9*. Kompleks ini disebut *apoptosome*.

Rasio antara pro-survival dan pro-apoptosis lebih penting dibanding level masing-masing di dalam sel. Pengaturan kesetimbangannya melibatkan regulasi transkripsional oleh p53. Protein p53 merupakan protein yang mengatur ekspresi gen dalam *cell cycle arrest* dan apoptosis. Ekspresi berlebihan p53 yang dipicu oleh kerusakan DNA, stress dan stimulasi onkogen. Menyebabkan overekspresi Bax yang merupakan pro-apoptosis. Rasio kesetimbangan prosurvival dan pro apoptosis bergeser mengarah pada bentuk homodimer Bax-Bax. Menyebabkan pelepasan sitokrom c dan aktivasi Apaf-1.

Protein p53 dapat memacu apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik (Sledge & Miller, 2003). Protein p53 terdiri dari 3 (tiga) domain fungsional, yaitu *transaktivating domain*, *sequence-specific zinc-binding domain*, dan *tetradimerization domain*. Terdapat 2 daerah pada *zinc-binding domain*, yaitu Loop L2 dan L3 (residu 163-195 dan 236-251) yang berperan penting pada pengikatan DNA dan stabilisasi protein (Schafer *et al.*, 2000). Protein p53 merupakan faktor transkripsi banyak gen yang mengatur proses apoptosis, daur sel dan angiogenesis.

#### **2.1.4 Tinjauan umum tentang kanker serviks**

Kanker serviks adalah tumor ganas primer yang berasal dari metaplasia epitel di daerah skuamokolumnar junction yaitu daerah peralihan mukosa vagina dan mukosa kanalis servikalis. Kanker serviks merupakan kanker yang terjadi pada serviks atau leher rahim, suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang merupakan pintu masuk ke arah rahim, letaknya antara rahim (uterus) dan liang senggama atau vagina. Kanker leher rahim biasanya menyerang wanita berusia 35-55 tahun. Sebanyak 90% dari kanker leher rahim berasal dari sel skuamosa yang melapisi serviks dan 10% sisanya berasal dari sel kelenjar penghasil lendir pada saluran servikal yang menuju ke rahim (Hacker, 2000).

Kanker serviks uteri adalah tumor ganas primer yang berasal dari sel epitel skuamosa. Sebelum terjadinya kanker, akan didahului oleh keadaan yang disebut lesi prakanker atau neoplasia intraepitel serviks (NIS). Penyebab utama kanker leher rahim adalah infeksi Human Papilloma Virus (HPV). Saat ini terdapat 138 jenis HPV yang sudah dapat teridentifikasi yang 40 di antaranya dapat ditularkan



lewat hubungan seksual. Beberapa tipe HPV virus risiko rendah jarang menimbulkan kanker, sedangkan tipe yang lain bersifat virus risiko tinggi. Baik tipe risiko tinggi maupun tipe risiko rendah dapat menyebabkan pertumbuhan abnormal pada sel tetapi pada umumnya hanya HPV tipe risiko tinggi yang dapat memicu kanker. Virus HPV risiko tinggi yang dapat ditularkan melalui hubungan seksual adalah tipe 7,16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69, dan mungkin masih terdapat beberapa tipe yang lain (Hacker, 2000).

Beberapa penelitian mengemukakan bahwa lebih dari 90% kanker leher rahim disebabkan oleh tipe 16 dan 18. Yang membedakan antara HPV risiko tinggi dengan HPV risiko rendah adalah satu asam amino saja. Asam amino tersebut adalah aspartat pada HPV risiko tinggi dan glisin pada HPV risiko rendah dan sedang (Gastout et al, 1996). Dari kedua tipe ini HPV 16 sendiri menyebabkan lebih dari 50% kanker leher rahim.

Seseorang yang sudah terkena infeksi HPV 16 memiliki resiko kemungkinan terkena kanker leher rahim sebesar 5%. Dinyatakan pula bahwa tidak terdapat perbedaan probabilitas terjadinya kanker serviks pada infeksi HPV-16 dan infeksi HPV-18 baik secara sendiri-sendiri maupun bersamaan (Bosch et al, 2002). Akan tetapi sifat onkogenik HPV-18 lebih tinggi daripada HPV-16 yang dibuktikan pada sel kultur dimana transformasi HPV-18 adalah 5 kali lebih besar dibandingkan dengan HPV-16. Selain itu, didapatkan pula bahwa respon imun pada HPV-18 dapat meningkatkan virulensi virus dimana mekanismenya belum jelas. HPV-16 berhubungan dengan skuamous cell carcinoma serviks sedangkan HPV-18 berhubungan dengan adenocarcinoma serviks. Prognosis dari adenocarcinoma kanker serviks lebih buruk dibandingkan skuamous cell carcinoma. Peran infeksi HPV sebagai faktor risiko mayor kanker serviks telah mendekati kesepakatan, tanpa mengecilkan arti faktor risiko minor seperti umur, paritas, aktivitas seksual dini/prilaku seksual, dan merokok, pil kontrasepsi, genetik, infeksi virus lain dan beberapa infeksi kronis lain pada serviks seperti klamidia trakomatis dan HSV-2 (Hacker, 2000)

FIGO	Deskripsi	Kategori TNM
	Tumor primer tidak dapat diases	TX
	Tidak ada bukti tumor primer	T0
0	Karsinoma insitu ( <i>preinvasive carcinoma</i> )	Tis
I	Karsinoma terbatas pada serviks	T1
IA	Karsinoma hanya dapat didiagnosis secara mikroskopik	T1a
IA1	Invasi stroma dalamnya < 3 mm dan lebarnya < 7 mm	T1a1
IA2	Invasi stroma dalamnya 3 – 5 mm dan lebarnya < 7 mm	T1a2
IB	Secara klinis, tumor dapat diidentifikasi pada serviks atau massa tumor lebih besar dari IA2	T1b
IB1	Secara klinis lesi ukuran < 4 cm	T1b1
IB2	Secara klinis lesi ukuran > 4 cm	T1b2
II	Tumor telah menginvasi uterus tapi tidak mencapai 1/3 distal vagina atau dinding panggul	T2
IIA	Tanpa invasi parametrium	T2a
IIB	Dengan invasi parametrium	T2b
III	Tumor menginvasi sampai dinding pelvis dan atau menginfiltrasi sampai 1/3 distal vagina, dan atau menyebabkan hidronefrosis atau gagal ginjal	T3
IIIA	Tumor hanya menginfiltrasi 1/3 distal vagina	T3a
IIIB	Tumor sudah menginvasi dinding panggul	T3b
IVA	Tumor menginvasi mukosa kandung kencing atau rektum dan atau menginvasi keluar dari <i>true pelvis</i>	T4a
IVB	Metastasis jauh	T4b

Tabel 1.1 Stadium kanker serviks menurut klasifikasi FIGO (Wiknyosastro (1997))

### 2.1.5 Tinjauan tentang kultur sel kanker serviks

Kultur sel HeLa atau HeLa *cell line* merupakan continuous cell lain yang diturunkan dari sel epitel kanker leher Rahim (cervix) seorang wanita penderita kanker leher Rahim bernama Henrietta Lack yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951. Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat dan digunakan sebagai model sel kanker untuk mempelajari sinyal transduksi seluler. Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan sebagai untuk kepentingan kultur sel. Sel HeLa bersifat immortal yang tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi dasar bagi sel untuk tetap hidup masih ada. Strain-strain baru dari sel HeLa berasal dari keturunan yang sama (Rosita *et al.*, 2012).

### 2.1.6 Cisplatin

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum-III) merupakan salah satu obat antikanker yang digunakan secara luas (Attesahin et al, 006 dalam Zulharini, 2013). Senyawa diaminodiklor ini dari platina (1979) bekerja sitostatik dengan jalan penghambatan sintesis DNA dan RNA (Tjay, 2007). Selain merupakan obat kanker golongan platinum, Cisplatin juga merupakan metal inorganik karena toksisitas Cisplatin yang mempunyai sitotoksitas sinergis dengan radiasi dan kemoterapi lain (Mary & Pamela, 2001; Departemen Farmakologi Terapi, 2008 dalam Zakiah, 2011).

Obat ini ditemukan secara kebetulan melalui observasi bahwa kompleks platinum menghambat pembelahan *Escherichia coli*. Golongan obat ini membunuh sel pada semua siklus pertumbuhannya, menghambat biosintesis DNA dan berikatan dengan DNA membentuk ikatan silang (*cross-linking*). Tempat ikatan utama adalah N7 pada guanin, namun juga terbentuk ikatan kovalen dengan adenin dan sitosin. Cisplatin terutama efektif untuk tumor padat seperti karsinoma paru, kanker esofagus, gaster, leher dan kepala, genito urinaria (testis, ovarium, buli-buli) (Departemen Farmakologi Terapi, 2008 dalam Zakiah, 2011).

Mekanisme kerja Cisplatin sama dengan alkilator. Golongan obat ini membunuh sel pada semua siklus pertumbuhannya, menghambat biosintesis DNA dan berikatan dengan DNA membentuk ikatan silang (*cross-linking*). Sitotoksitas dapat terjadi pada setiap tahap pengembangan siklus sel, tetapi sel yang paling peka adalah fase G1 dan S. Tempat ikatan utama adalah N7 pada guanin, namun juga terbentuk ikatan kovalen dengan adenin dan sitosin. Pada lingkungan plasma yang tinggi klorida, cisplatin menetapkan sebagai jenis netral, yang masuk sel dan terikat pada N' guanin DNA, membentuk *cross-link* inter- dan intra- strand. Lesi sitotoksik yang menghambat sintesis DNA dan RNA (Mary & Pamela, 2001 dalam Zakiah, 2011)

Cisplatin diberikan intravena dalam cairan garam, obat ini juga dapat diberikan interperitoneal untuk kanker ovarium. Lebih dari 90% cisplatin diikat oleh serum protein. Konsentrasi tertinggi ditemukan dalam hati, ginjal, usus, sel-sel testis dan ovarium, tetapi sedikit yang masuk cairan serebrospinal (CSS).

Ginjal merupakan saluran ekskresi yang utama (Mary & Pamela, 2001 dalam Zakiah, 2011).

Efek samping dari cisplatin antara lain muntah yang hebat dan persisten terjadi 1 jam setelah pemberian cisplatin dan dapat berlangsung selama 5 hari. Pramedikasi dengan antiemetik biasanya dapat menolong. Toksisitas terbatas yang paling sering adalah nefrotoksisitas yang tergantung dosis, menyangkut tubulus renalis kontortus distal dan tubulus renalis rektus. Keadaan ini diperburuk oleh hidrasi hebat dan diuresis (Mary & Pamela, 2001 dalam Zakiah, 2011). Hidrasi yang cukup dan garam fisiologis atau manitol penting untuk mengurangi nefrotoksisitas. Selain itu cisplatin juga menyebabkan neurotoksisitas perifer yang irreversibel (Departemen Farmakologi Terapi, 2008 dalam Zakiah, 2011).

#### **2.1.7 Fluorurasil (5-FU)**

Derivat pirimidin ini (1962) merintangi sintesa DNA melalui saingan dengan pirimidin (Tjay, 2007). 5-FU adalah antimetabolit yang bekerja secara antagonis dengan timin terhadap aktivitas enzim timidilat sintetase (TS). 5-FU merupakan prodrug, metabolisme 5-FU menghasilkan fluoridin-5'-trifosfat (FUTP) yang bergabung ke dalam RNA dan mempengaruhi fungsinya, dan fluorodeoksiuridilat (FdUMP) yang menghambat replikasi DNA (ccrc.farmasi.ugm.ac.id).

Pada kaitannya dengan daur sel, 5-FU tidak dapat bekerja pada sel yang berada di luar daur sel (G0). 5-FU hanya bekerja pada sel yang aktif menjalankan daur sel di mana diperlukan aktivitas TS untuk sintesis basa penyusun DNA. TS diekspresikan tinggi pada fase G1 melalui perantara aktivitas transkripsi dari E2F. Setelah diekspresikan, TS sendiri langsung mensintesis prekursor dUMP yang diperlukan dalam fase sintesis. Perlakuan dengan 5-FU pada sel kanker dapat menyebabkan akumulasi sel pada fase G1 dan awal fase sintesis (*G1/S arrest*) (Liu *et al.*, 2006 dalam ccrc.farmasi.ugm.ac.id). Namun, bagaimanapun aktivitas penghambatan daur sel oleh 5-FU tergantung pada jenis sel kanker.

5-FU dapat menginduksi terjadinya penghentian daur sel dan pemacuan apoptosis tanpa melibatkan peran p53, tetapi melibatkan peningkatan ekspresi p21 dan pRb. Kedua protein tersebut memiliki peran penting dalam sistem

*checkpoint* pada fase G1. Ekspresi pRb tinggi akan menghambat aktivitas E2F sehingga menyebabkan penghambatan sel untuk melampaui R. Ekspresi p21 akan menghambat aktivitas cyclin E/CDK2 dan cyclin A/CDK2 sehingga dapat menyebabkan penghambatan daur sel pada fase G1 dan S. Sel yang berada pada fase G1 akan terhenti pada fase G1, sedangkan sel yang berada fase S akan terhenti pada fase tersebut. Resistensi yang disebabkan oleh 5-FU dapat terjadi melalui perantaraan penghambatan daur sel. Sel kanker dengan *p21* mutan tidak dapat memacu penghentian daur sel sehingga langsung memacu apoptosis tetapi sel dengan *p21* normal yang memacu penghentian daur sel akan memicu munculnya sel yang resisten. Aktivitas 5-FU dalam pemacuan apoptosis dapat melalui jalur p53 atau tidak (*dependent or independent p53*) (Levrero *et al.*, 2000 dalam ccrc.farmasi.ugm.ac.id). Hal ini dibuktikan bahwa 5-FU dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker yang mengalami defisiensi p53 atau memiliki *p53* mutan.

Efek samping dari 5-FU yang ditemukan pada pasien antara lain neutropenia, stomatitis, diare, dan *hand-food syndrome*. Masing-masing efek ini terkait dengan metode pemberian yang diterapkan pada pasien (Meyerhardt *and* Mayer, 2005 dalam ccrc.farmasi.ugm.ac.id). Pada kasus yang efek samping 5-FU yang paling parah adalah kardiotositas meskipun hal ini jarang ditemui (Thomas *et al.*, 2004 dalam ccrc.farmasi.ugm.ac.id). Dibandingkan dengan agen kemoterapi yang lain, 5-FU memiliki selektivitas yang tinggi pada aktivitas TS dan efek samping yang ditimbulkan relatif lebih ringan. Meskipun demikian, efektivitas 5-FU sebagai agen kemoterapi baru mencapai 15% sehingga diperlukan pengembangan agen kokemoterapi untuk meningkatkan efektivitas terapi dengan 5-FU (Meyerhardt *and* Mayer, 2005 dalam ccrc.farmasi.ugm.ac.id).

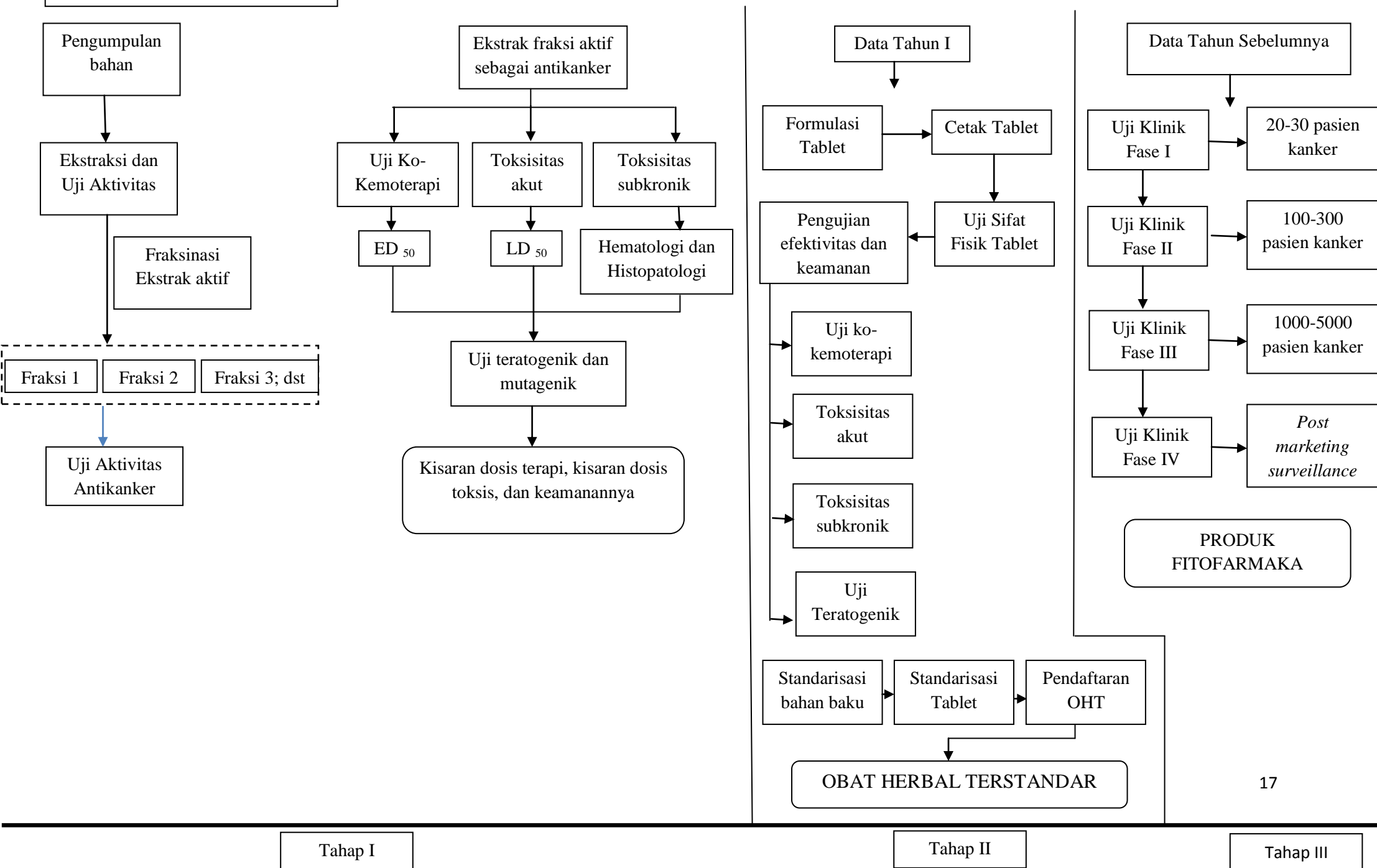
## **1.2 Roadmap**

Penelitian ini merupakan penelitian yang berkelanjutan. Paket penelitian ini akan dikerjakan kurang lebih 4-7 tahun berturut-turut dengan tujuan akhir mendapatkan sediaan Fitofarmaka yang terstandar sebagai agen ko-kemoterapi. Tahapan yang dilakukan meliputi: tahap I, II dan III. Tahap pertama adalah tahap untuk penentuan mutu dan keamanan ekstrak. Tahap kedua adalah tahap untuk

menentukan mutu dan keamanan bentuk sediaan tablet. Tahap ke-III adalah tahapan uji klinik. Pada tahap I dan II akan diperoleh hasil akhir berupa sediaan obat herbal terstandar (OHT) Ko-kemoterapi. Sedangkan pada tahap III akan diperoleh hasil akhir berupa sediaan fitofarmaka.

Penelitian selanjutnya dijelaskan pada skema di bawah ini :

## ROAD MAP PENELITIAN



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan “*True experimental Design*” yaitu penelitian eksperimental murni dengan membandingkan hasil yang didapatkan setelah perlakuan pada kontrol positif dan kontrol negatif. Perlakuan terhadap semua sampel dilakukan secara bersamaan dan setelah lama perlakuan pengamatan dilakukan secara bersama-sama pula dengan menggunakan jenis *Postes Only Kontrol Group Design* (Notoatmodjo, 2002).

#### **3.2 Tempat dan waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Jogjakarta. Penelitian ini akan dilakukan bulan Maret sampai September 2016.

#### **3.3 Bahan dan Alat**

##### **a. Bahan Uji**

Bahan tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Eleutherine bulbosa* dan *Macrosolen cochinchinensis* yang diambil dari kota malang Jawa Timur. Bagian tanaman yang akan diambil adalah bagian daun. Pengeringan dilakukan di dalam oven suhu 50°C. Simplisia yang telah kering diserbuk dan dimasukkan dalam botol coklat yang kering.

##### **b. Bahan untuk ekstraksi**

Pelarut yang akan digunakan untuk tahap ekstraksi maserasi adalah etanol 70%, dan etil asetat.

##### **c. Bahan untuk kultur sel**

Sel kanker yang akan digunakan pada penelitian ini adalah sel *line* kanker leher rahim HeLa, sel tersebut akan diperoleh dari *Cancer Chemoprevention*



*Research Centre (CCRC), Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dan dari Prof. Masasi Kawaichi, laboratorium of Gene Function in Animal, Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology.*

Sel HeLa, masing-masing dalam medium *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) ditambah dengan 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories), 1% v/v penicillin-streptomycin (Nacal Tesque), dan 1,0mM L-glutamin (Nacal Tesque). kemudian sel dikultur dalam incubator, pada 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> suhu 37°C.

#### **d. Bahan uji sitotoksik**

Dimetil sulfoksida (DMSO), akan digunakan untuk melarutkan ekstrak *Eleutherine bulbosa* dan *Macrosolen cochinchinensis*. konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian ini maksimal 1% dalam medium kultur. 0,025% tripsin dalam medium kultur digunakan untuk memanen sel. Phosphate buffer saline (PBS) digunakan sebagai larutan penyangga pencuci. 3-(4,5-dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) digunakan sebagai reagen yang bereaksi dengan enzim suksinat dehidrogenase pada sel. Cisplatin (sigma) dan 5-Fluorouracil (sigma) sebagai agen kemoterapi yang akan dikombinasikan dengan ekstrak bawang sabrang dan ekstrak benalu belimbing.

#### **e. Bahan untuk flowcytometry**

Larutan *propidium iodide* (PI) (Sigma) yang terdiri dari 50 µg/mL PI, 20µg/mL, dan 0.1% Triton X 100 (Pro GC-Merck) dalam PBS. Filter digunakan untuk menyaring Sel dalam larutan PI agar terpisah menjadi sel tunggal.

#### **a. Alat**

Alat utama yang diperlukan dalam penelitian ini adalah maserator, evaporator, sentrifuse , tangki nitrogen cair, CO<sub>2</sub>-Jacketed Incubator, mikroskop fase kontras, *Laminar Air Flow cabinet* (Nuair), *Elisa reader*, flowcytometer (FACSalibur).

### **3.4 Jalannya Penelitian**

#### **a. Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman akan dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

#### **b. Ekstraksi**

Di masukkan 10 bagian simplisia dengan debelimbingt halus kedalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup, biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, diserkai, diperas, ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Dipindahkan kedalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Di enapkan tuangkan dan di saring. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan lalu diuapkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C. ekstrak kental yang diperoleh kemudian di keringkan di desikator vakum dan selanjutnya dialiri gas N<sub>2</sub> untuk menghilangkan semua sisa pelarut pada ekstrak (BPOM, 2010).

#### **c. Uji aktivitas antikanker dengan metode MTT**

Suspensi sel kanker leher rahim HeLa sebanyak 100 µL dengan kepadatan  $3 \times 10^4$  sel/100 µL media didistribusikan ke dalam sumuran- sumuran pada 96-*well plate* dan diinkubasikan selama 24 jam. Setelah diinkubasi, ke dalam sumuran dimasukkan 100 µL larutan uji pada berbagai seri konsentrasi. Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak *Eleutherine bulbosa* tunggal dan kombinasi dengan 5-Fluorouracil dan cisplatin. Larutan uji yang lainnya adalah ekstrak *Macrosolen cochinenesis* tunggal dan kombinasi dengan 5-Fluorouracil dan cisplatin. Sebagai kontrol positif ditambahkan 100 µL medium kultur, kemudian 100 µL *Macrosolen cochinensis*; dan 100 µL *Eleutherine bulbosa* dan 100 µL *Macrosolen cochinensis*, pada berbagai seri konsentrasi ke dalam sumuran yang telah berisi 100 µL suspensi sel. Sebagai kontrol sel ditambahkan 100 µL medium kultur ke dalam sumuran yang berisi 100 µL suspensi sel dan sebagai kontrol pelarut ditambahkan 100 µL DMSO ke dalam sumuran yang berisi 100 µL medium kultur dan 100 µL suspensi sel dengan delusi yang sesuai dengan delusi konsentrasi larutan uji, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO<sub>2</sub> dan 95% O<sub>2</sub>. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang

lalu ditambahkan 10  $\mu$ L larutan MTT (5 mg/mL PBS), dan medium diganti dengan 190  $\mu$ L medium RPMI 1640 komplet. Kemudian sel diinkubasi selama 3-4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen *stopper* SDS (100  $\mu$ L). *Microplate* kemudian dibungkus dengan *tissue* dan diinkubasi selama 1 malam pada suhu kamar dan ruangan gelap. Sel yang hidup bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Hasil pengujian dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm (Ola *et al.*, 2008; Mae *et al.*, 2000 dalam Dheta, 2009).

# 1. *Well plate maping* Uji sitotoksik

Penentuan IC50 ekstrak bawang sabrang dan benalu belimbing

	Sel HeLa +BS			Sel HeLa +BR			Sel Vero + BS			SEL Vero +BR		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	KS HeLa			KM. HeLa			KS. Vero			KM.Vero		

Keterangan: BS: Bawang Sabrang

BR: Benalu Belimbing

## 2. *Well plate mapping* uji kombinasi

Uji kombinasi BS (Bawang Sabrang) dan BR (Benalu Belimbing)

				BS : BR								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BS	½ IC50	½ IC50 BS : ½ IC50 BR				½ IC50 BS : ¼IC50 BR			KOSONG		
B		¾ IC50	¾ IC50 BS : ½ IC50 BR				¾ IC50 BS : ¼IC50BR					
C		¼IC50	¼IC50 BS : ½ IC50 BR				¼IC50 BS : ¼IC50BR					
D		⅛ IC50	⅛ IC50 BS : ½ IC50 BR				⅛ IC50 BS : ¼IC50BR					
E	BR	½ IC50	½ IC50 BS : ¾ IC50 BR				½ IC50 BS : ⅛ IC50 BR			KONTROL SEL		
F		¾ IC50	¾ IC50 BS : ¾ IC50 BR				¾ IC50 BS : ⅛ IC50 BR					
G		¼IC50	¼IC50 BS :¾ IC50 BR				¼IC50 BS : ⅛ IC50 BR			KONTROL MEDIA		
H		⅛ IC50	⅛ IC50 BS : ¾ IC50 BR				⅛ IC50 BS : ⅛ IC50 BR					

### d. Analisis daur sel dengan *flowcytometry*

Pada analisis daur sel ini digunakan pewarna Propidium Iodide (PI). Pewarna ini dapat digunakan analisis jumlah set DNA pada setiap sel. Sel sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/sumuran ditanam dalam 6-well plate kemudian sel diinkubasikan hingga normal kembali. Sel diberi perlakuan pelarut DMSO (0.25%) dan isolate aktif pada IC<sub>50</sub>. Sel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir waktu inkubasi, media diambil dan ditransfer ke dalam tabung sentrifius dan disentrifius (2000 rpm, 3 menit) kemudian supernatan dibuang. Pada sumuran yang telah diambil medianya, ditambah PBS, dan PBS ditransfer ke *microtube* yang sama dari satu perlakuan, kemudian disentrifugasi lalu supernatan dibuang. Tahap ini diulangi sekali lagi kemudian sel dipanen dengan tripsin. Sel ditransfer ke dalam *microtube* yang sama kemudian disentrifugasi (2000 rpm, 3 menit). Sisa panen sel yang berada pada sumuran dibilas dengan PBS dan disentrifugasi lagi, kemudian PBS dibuang. Endapan sel dalam *microtube* kemudian difiksasi dengan 70% etanol, -20°C, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang atau semalam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi (2000 rpm, 3 menit). Endapan sel dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali kemudian ditambah reagen PI dengan hati-hati, dan segera dihomogenkan. *Microtube* yang berisi

suspensi sel dibungkus aluminium foil dan diinkubasi dalam penangas air 37°C selama 20 menit. Suspensi sel dihomogenkan kembali dan ditransfer ke dalam tabung *flowcytometer* dengan menggunakan filter nilon, selanjutnya siap dianalisis dengan *flowcytometer*.

**e. Analisis induksi Apoptosis sel dengan *flowcytometry***

Sel sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/sumuran ditanam dalam 6-well plate kemudian sel diinkubasikan hingga normal kembali. Sel diberi perlakuan pelarut DMSO (0,25%) dan isolate aktif. Sel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir waktu inkubasi, media diambil dan ditransfer ke dalam tabung sentrifius dan disentrifius (2000 rpm, 3 menit) kemudian supernatan dibuang. Pada sumuran yang telah diambil medianya, ditambah PBS, dan PBS ditransfer ke *microtube* yang sama dari satu perlakuan, kemudian disentrifugasi lalu supernatan dibuang. Tahap ini diulangi sekali lagi kemudian sel dipanen dengan tripsin. Sel ditransfer ke dalam *microtube* yang sama kemudian disentrifugasi (2000 rpm, 3 menit). Sisa panen sel yang berada pada sumuran dibilas dengan PBS dan disentrifugasi lagi, kemudian PBS dibuang. Endapan ditambah reagen PI-Annexin V dengan hati-hati, dan segera dihomogenkan. *Microtube* yang berisi suspensi sel dibungkus aluminium foil dan diinkubasi dalam penangas air 37°C selama 5 menit. Suspensi sel dihomogenkan kembali dan ditransfer ke dalam tabung *flowcytometer* dengan menggunakan filter nilon, selanjutnya siap dianalisis dengan *flowcytometer*.

**f. Analisis Apoptosis dengan pengecatan *Ethidium bromide/Acridine orange***

Sel HeLa, masing-masing diresuspensikan dalam media RPMI sehingga diperoleh  $5 \times 10^5$  sel / ml yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum (FBS), 25 mM HEPES, 100 unit/ml penisilin, 100 µg/ml dan 50 µg/ml gentamisin dan kemudian diinkubasi pada suhu 37° C dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Senyawa uji dilarutkan dalam DMSO dan dibuat dengan konsentrasi yang telah ditentukan kemudian ditambahkan ke dalam biakan kultur sel kanker dan diinkubasi selama 24 jam. Efek induksi apoptosis digunakan sel kanker hasil perlakuan dan kemudian sel ditambah RPMI 1640 disentrifugasi pada suhu 4°C, 800 rpm selama 5 menit. Medium tersebut kemudian dibuang, sebagian sel

selanjutnya dipindahkkan ke dalam gelas objek dan kemudian ditambah dengan metanol 4% dalam PBS pH7,4 dan dibiarkan selama 25 menit pada suhu 4°C. Campuran ini kemudian dicuci dan ditambahkan pereaksi etidium bromide–acridin orange ( 1:1), dan biarkan selama 1 menit dalam suhu kamar dan ditutup dengan gelas penutup. Selanjutnya yang terwarnai diamati pada mikroskop flouresens. Sel yang mengalami apoptosis akan terlihat berwarna orange flouresens hal ini disebabkan adanya ikatan antara etidium-bromida dengan DNA terfragmentasi dari sel kanker yang mengalami apoptosis , sedangkan untuk sel yang hidup akan menunjukkan warna hijau. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung untuk tiap lapang pandang dengan jumlah minimal 100 sel (Spector, 1998).

#### g. Analisis data

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup.:

$$\text{Prosentase (\%) sel hidup} = \frac{(\text{abs.perlakuan} - \text{abs.kontrol media})}{(\text{abs.kontrol sel} - \text{abs.kontrol media})} \times 100\%$$

Keterangan: Abs : absorbansi

Prosentase sel hidup dihitung untuk memperoleh nilai IC50 yaitu konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sebanyak 50% dari populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksiknya. Nilai IC50 ditentukan dengan analisis probit (*Statistic Product and Service Solution* (SPSS) 16.0 for windows).

Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistic menggunakan paired-samples T-test (SPSS 16.0 for windows) dengan taraf kepercayaan 95%. Perbedaan dengan rerata pada  $p < 0,05$  dianggap signifikan, sedangkan  $p > 0,05$  tidak signifikan secara statistic.

Sitotoksitas kombinasi ditetapkan dengan menghitung indeks interaksi antara agen kemoterapi dengan *G. procumbens*, menggunakan persamaan:

$$\text{Combination Index/CI} = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2$$

Dimana D1 dan D2 adalah konsentrasi sampel yang digunakan dalam perlakuan kombinasi. (Dx)1 dan (Dx)2 adalah konsentrasi tunggal yang dapat menghasilkan efek sebesar yang diberikan perlakuan kombinasi (Reynold dan Maurer, 2005). Angka CI atau Combination Index yang diperoleh diinterpretasikan sebagai berikut: < 0.1 sinergis sangat kuat, 0.1-0.3 sinergis kuat, 0.3-0.7 sinergis, 0.7-0.9 sinergis ringan-sedang, 0.9-1.1 antagonis ringan-sedang, 1.45-.3 antagonis, > antagonis kuat-sangat kuat.

#### **h. Analisis data siklus sel dengan *flowcytometry***

Data distribusi sel dalam setiap fase siklus sel dari *flowcytometry* dianalisis dengan program modfit LT3 untuk melihat distribusi sel pada fase-fase sel sub G1 (apoptosis), G1, S, G2/M. penghambatan daur sel yang terjadi dapat diketahui dengan membandingkan antara efek perlakuan larutan uji dengan kontrol. Uji ini dilakukan untuk melihat adanya perubahan *Cell cycle progression* akibat pemberian sampel uji dengan perhatian pada setiap fase pembelahan sel.

#### **i. Analisis Data Induksi apoptosis sel dengan *flowcytometry* (Reager *et al.*, 2011)**

Pada analisis induksi apoptosis ini digunakan pengecatan kombinasi antara *Propidium iodine* (PI) dan annexin-V, dengan kombinasi pengecatan ini akan diketahui perbedaan sel yang viable (hidup), apoptosis dan sel nekrosis. Selain itu dari uji ini juga akan diketahui sel yang mengalami *early apoptosis* dan sel yang *late apoptosis*. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistik menggunakan paired-samples T-test (SPSS 16.0 for windows) dengan taraf kepercayaan 95%. Perbedaan dengan rerata pada  $p < 0,05$  dianggap signifikan, sedangkan  $p > 0,05$  tidak signifikan secara statistik.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1.1 Preparasi Sampel benalu belimbing

Sampel berupa daun benalu belimbing (*Maccrosolen cochinchinensis*) yang diperoleh dari daerah sekitar Kecamatan Durenan, Kabupaten Trenggalek. Sampel yang diperoleh tersebut akan dipreparasi agar diperoleh simplisia daun benalu yang siap untuk diekstraksi. Adapun proses preparasi sampel yang dilakukan meliputi pencucian, pengeringan, dan penyerbukan. Pencucian dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan debu maupun kotoran yang menempel pada permukaan daun. Pencucian dilakukan menggunakan air yang mengalir. Daun benalu yang telah bebas dari debu dan kotoran dipotong kecil-kecil dan diangin-anginkan agar air bekas pencucian hilang dan kering selama 3 hari. Proses penganginan daun yang telah dipotong tidak boleh terkena sinar matahari langsung, sehingga daun dianginkan pada tempat teduh dan ditutupi lapisan atas wadah daun dengan kain hitam.

Proses selanjutnya setelah diangin-anginkan adalah pengeringan menggunakan oven pada suhu 30 – 37 °C selama  $\pm$  21 jam. Perlakuan ini bertujuan untuk mengkeringkan dan menghilangkan kadar air dalam daun benalu untuk mempermudah dalam penyerbukan. Selanjutnya daun yang telah kering di serbuk dengan *blender* hingga terbentuk serbuk. Perlakuan ini bertujuan untuk memperluas permukaan sehingga mudah dalam pengestraksian. Serbuk yang diperoleh disebut sebagai sampel daun benalu Belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*). Serbuk berwarna hijau pudar dengan berat 76,178 gram. Selanjutnya serbuk halus yang diperoleh diekstraksi maserasi.

#### 4.1.2 Ekstraksi Maserasi Daun Benalu (*Macrosolen cochinchinensis*)

Pada tahap ini dilakukan ekstraksi maserasi terhadap serbuk daun benalu yang dihasilkan dengan tujuan mendapat ekstrak dari benalu. Ekstraksi merupakan cara memisahkan zat terlarut melalui dua buah pelarut (biasanya cair)



yang dapat melarutkan zat tersebut namun kedua pelarut ini tidak dapat saling melarutkan (*immisible*) (Wonorahardjo, 2013).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Prinsip utama dalam maserasi adalah mengekstrak senyawa aktif yang terdapat dalam pelarut berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing pelarut (*like dissolves like*) (Khopkar, 2008). Voight (1994) menjelaskan bahwa metode ini didasarkan pada perendaman sampel dengan pelarutnya pada suhu ruang, selanjutnya sampel akan mengalami pemecahan dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut pada pelarut.

Serbuk daun benalu belimbing yang diperoleh dimaserasi dengan etanol 96% dengan perbandingan serbuk dan pelarut 1:10. Pemilihan etanol sebagai pelarut dikarenakan etanol mudah dalam melarutkan semua zat yang bersifat polar, semipolar, dan non polar. Pada saat proses maserasi dilakukan pengantian pelarut setiap harinya hingga diperoleh filtrat bening yang mengindikasikan senyawa telah terekstrak secara maksimal (Voight, 1995). Dalam hal ini 76,178 gram serbuk dimaserasi dengan 800 ml etanol 96% yang mana sebanyak pelarut itu akan dibagi menjadi beberapa bagian untuk memaserasi serbuk, sehingga tidak 800 ml etanol 96% tidak langsung digunakan untuk sekali perendaman (maserasi).

Hasil dari perendaman berupa filtrat yang diperoleh dari proses filtrasi menggunakan corong buchner. Prinsip penyaringan dengan corong *Buchner* adalah penyaringan secara mekanis berdasarkan ukuran molekul, sehingga molekul yang berukuran lebih besar akan tertahan pada kertas saring (Vogel, 1978). Semua filtrat yang terkumpul kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 60 °C. Saifudin ddk (2011) menyatakan bahwa filtrat etanol dapat dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 55-60°C. Proses ini dihentikan pada saat pelarut sudah tidak menetes lagi pada labu alas bulat.

Pemekatan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* menghasilkan ekstrak pekat yang berupa padatan berwarna hijau tua pekat. Ekstrak pekat tersebut kemudian dihitung randemennya yang hasil penghitungannya ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil maserasi ekstrak etanol 96 % daun benalu Belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*)

Pelarut	Serbuk + pelarut yang digunakan	Perubahan Warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/b)
Etanol 96 %	76,178 g + 800 mL	Hijau pekat sampai hijau kekuningan bening	Hijau tua pekat	9,16 g	12,02447%

#### 4.1.3 Preparasi dan Ekstraksi Maserasi Bawang Sabrang

Sebelum dilakukan maserasi, sebanyak 3 kg bawang dayak dibersihkan kulitnya lalu dipotong kecil-kecil, dioven hingga kering dan dihancurkan dengan blender. Didapat simplisia sebanyak 483,0904 gr. Simplisia tersebut kemudian dimaserasi. Maserasi bawang sabrang menggunakan etanol sebagai pelarut. Etanol dipilih karena selain relatif aman, sebagian besar senyawa organik larut dalam etanol. Etanol yang digunakan sebanyak 5 L dengan 4 kali maserasi. Setiap selesai maserasi, filtrat dikumpulkan sedangkan endapan dimaserasi lagi sampai 4 kali maserasi. Setelah maserasi selesai, filtrat dirotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak pekat.

Ekstrak pekat yang didapat dari bawang sabrang adalah sebesar 54,6067gr. Dari berat ekstrak tersebut, dihitung rendemen dengan rumus sebagai berikut: (Risnawati, 2007)

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat simplisia awal (g)}} \times 100\%$$

melalui perhitungan tersebut, diperoleh rendemen sebesar 11.303%

#### **4.2 Hasil uji aktivitas ekstrak benalu belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*) dan ekstrak bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*)**

Pada penelitian ini digunakan kultur sel kanker leher rahim (*Hela Cell Line*). Kultur sel HeLa atau HeLa cell line merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (cervix) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951 (Anonim, 2006a). Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat (Anonim, 2000) dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler (Anonim, 2006b). Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (LabWork, 2000). Sel ini oleh George Gey. Sel ini diperlakukan sebagai sel kanker yang dipercaya berasal dari sel kanker leher rahim Ms.Lacks, namun klasifikasi dari sel ini masih diperdebatkan. HeLa bersifat imortal yang tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi dasar bagi sel untuk tetap hidup masih ada. Strain-strain baru dari sel HeLa telah dikembangkan dalam berbagai macam kultur sel, tapi semua sel HeLa berasal dari keturunan yang sama. Sel HeLa telah mengalami transformasi akibat infeksi human papillomavirus 18 (HPV 18) dan berbeda dengan sel leher rahim yang normal (Anonim, 2006c).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney, 1986). Sel HeLa adalah sel kanker leher rahim akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat imortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang imortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan

tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin dan DiMaio, 2000).



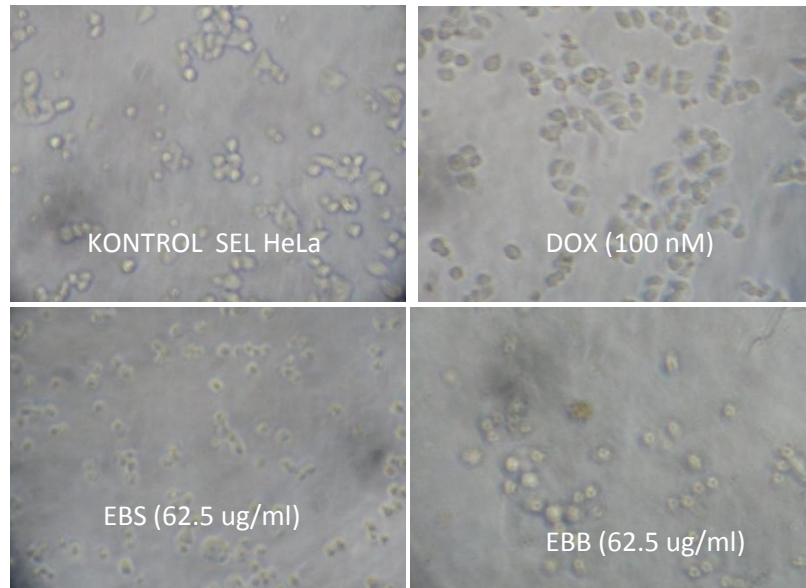
**Gambar 6.** Morfologi sel l diinkubasi pada  $\mu$ HeLa (a) Sel HeLa dengan kepadatan  $2 \times 10^4/100$  suhu  $37^\circ\text{C}$  sampel dengan seri konsentrasi selama 24 jam,  $\mu\text{C}$  dengan 100 direaksikan dengan MTT selama lebih kurang 6 jam, MTT akan dipecah oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium membentuk formazan (b) Morfologi sel HeLa tanpa perlakuan (CCRC UGM, 2013)

Protein E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur daur sel. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. Protein E6 juga menstimulasi aktivitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk cell cycle progression (DeFilippis, *et al* 2003). Sebagian besar sel kanker leher rahim, termasuk sel HeLa, mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk wild type. Jadi, gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal ini juga terdapat dalam sel kanker leher rahim. Namun, aktivitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin dan DiMaio, 2000)

Tabel 4.3 Rata-rata persen viabilitas sel dan nilai  $\text{IC}_{50}$  crude ekstrak benalu belimbing dan bawang sabrang terhadap sel kanker HeLa

No	Ekstrak	Rata-rata % viabilitas sel Hela pada konsentrasi uji ( $\mu\text{g/mL}$ )							$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
		7.813	15.625	31.25	62.5	125	250	500	
1	Ekstrak Benalu belimbing (EBB)	99.09	99.54	94.53	85.09	85.41	38.22	18.76	217.72
2	Ekstrak Bawang Sabrang (EBS)	66.41	77.05	56.38	56.00	32.59	7.45	6.91	40.36

Dari tabel 4.3 dapat diketahui bahwa EBS ( $IC_{50}$  : 40.36  $\mu\text{g/ml}$ ) mempunyai aktivitas antikanker yang lebih tinggi dibandingkan dengan EBB ( $IC_{50}$  : 217.72  $\mu\text{g/ml}$ ).



Gambar 4.2 Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel (aktifitas antikanker) karena perlakuan ekstrak bawang sabrang (EBS), ekstrak benalu belimbing (EBB), Doxorubisin pada sel kanker HeLa dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak  $10^4$  sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplit. A. Morfologi sel diamati di bawah mikroskop fase kontras (a) control sel He La; (b) Doxorubisin; (c) EBS (62.5  $\mu\text{g/ml}$ );. Perubahan yang terjadi tampak pada perlakuan EBS (b) dan EBB (d) yaitu terjadi *blebbing* ( $\rightarrow$ ), membesar ( $\rightarrow$ ) dan berserabut ( $\rightarrow$ ) dengan perbesaran 200x.

#### 4.3 Hasil uji Tosisitas ekstrak benalu belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*) dan ekstrak bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) terhadap sel normal (Sel Vero)

Hasil uji aktivitas antikanker Ekstrak benalu belimbing dan ekstrak bawang sabrang pada sel kanker HeLa menunjukkan potensi yang cukup tinggi. Sebelum dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensinya sebagai antikanker perlu dipastikan terlebih dahulu efek sitotoksiknya terhadap sel

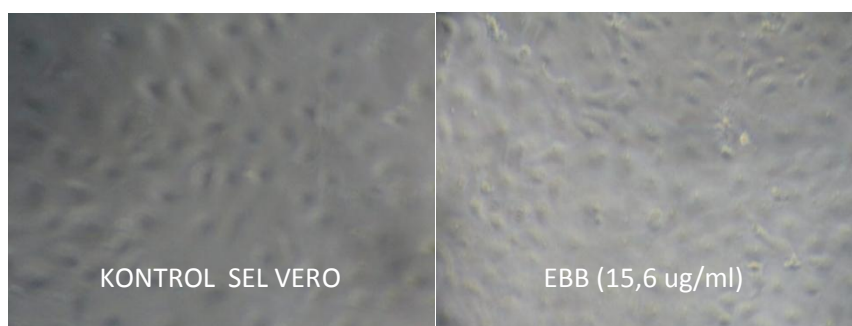
normal. Efek toksik pada sel normal menjadi permasalahan besar pada terapi kanker, berupa efek samping yang dapat menurunkan kualitas hidup pasien.

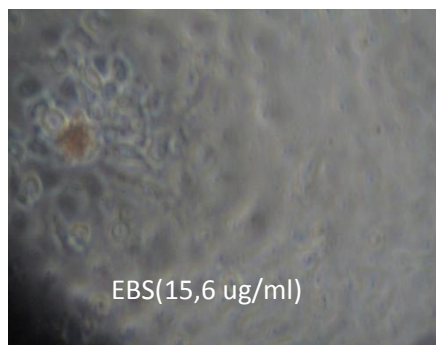
Efek toksisitas ekstrak disajikan pada tabel 4.4 di bawah ini:

Tabel 4.4 Rata-rata persen viabilitas sel dan nilai  $IC_{50}$  *crude* ekstrak benalu belimbing dan bawang sabrang terhadap sel normal Vero

No	Ekstrak	Rata-rata % viabilitas sel vero pada konsentrasi uji ( $\mu\text{g/mL}$ )							$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
		15.625	31.25	62.5	125	250	500	1000	
1	Ekstrak Benalu belimbing (EBB)	94.86	96.88	94.45	102.9	95.28	86.98	15.59	883.396
2	Ekstrak Bawang Sabrang (EBS)	126.8	118.26	119.24	99.95	17.30	10.87	8.43	232.865

Untuk mengetahui tingkat selektifitas ekstrak dalam arti ekstrak secara selektif dapat membunuh sel kanker HeLa tanpa membunuh sel normal, maka perlu dilakukan penghitungan selektifitas indeks. Ekstrak dikatakan selektif apabila nilai selektifitas indeks lebih besar dari 3 (Prayong *et al*, 2008). Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa EBB mempunyai *selectivity Index* sebesar 4.06 sedangkan EBS mempunyai *selectivity Index* sebesar 5.77; dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa EBB dan EBS selektif terhadap sel kanker HeLa





**Gambar 4.3** gambaran morfologi sel Vero karena perlakuan ekstrak bawang sabrang (EBS), ekstrak benalu belimbing (EBB), pada sel normal Vero dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak  $10^4$  sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplit. Morfologi sel diamati di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 200x.

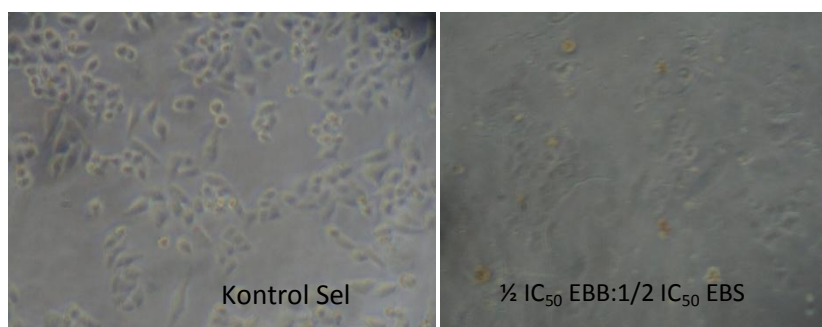
**Tabel SI (selectivity Index)** ekstrak Benalu belimbing dan bawang sabrang

No	Ekstrak	Hela IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vero IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	SI (selectivity Index)	Keterangan
1	EBB	217.715	883.4	4.06	Selektif*
2	EBS	40.361	232.87	5.77	Selektif*

\*Ekstrak bersifat selektif terhadap sel kanker HeLa jika  $SI > 3$

#### 4.4 Uji aktivitas kombinasi ekstrak benalu belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*) dan ekstrak bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) terhadap sel kanker HeLa

Setelah diketahui bahwa EBS dan EBB mempunyai aktivitas antikanker dan bersifat selektif terhadap sel HeLa maka selanjutnya dilakukan uji aktivitas dalam bentuk kombinasi untuk mengetahui potensi sinergistik kedua ekstrak tersebut.



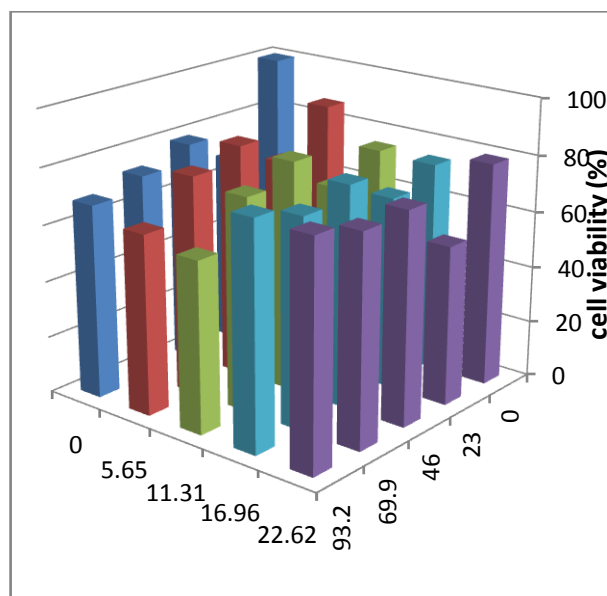
**Gambar 4.3** gambaran morfologi sel HeLa karena perlakuan kombinasi ekstrak bawang sabrang (EBS) dengan ekstrak benalu belimbing (EBB) dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak  $10^4$  sel/sumuran ditanam dalam 96 *well plate*, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplit. Morfologi sel diamati di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 200x

Tabel Hasil Uji Kombinasi EBS dan EBB

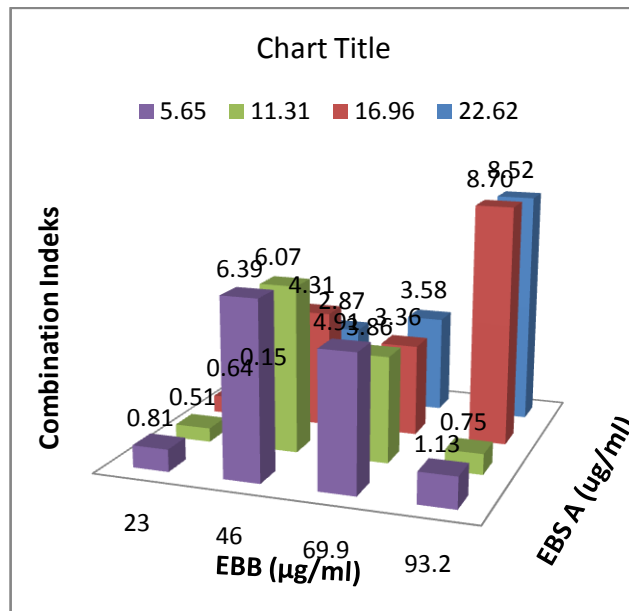
EBS	EBN			
	23	46	69.9	93.2
5.65	0.81	6.39	4.91	1.13
11.31	0.51	6.07	3.86	0.75
16.96	0.64	4.31	3.36	8.70
22.62	0.15	2.87	3.58	8.52

EBS	EBN			
	23	46	69.9	93.2
5.65	0.87	9.49	6.00	1.16
11.31	0.55	10.74	5.02	0.78
16.96	0.72	7.18	4.55	15.93
22.62	0.15	4.29	5.25	17.06

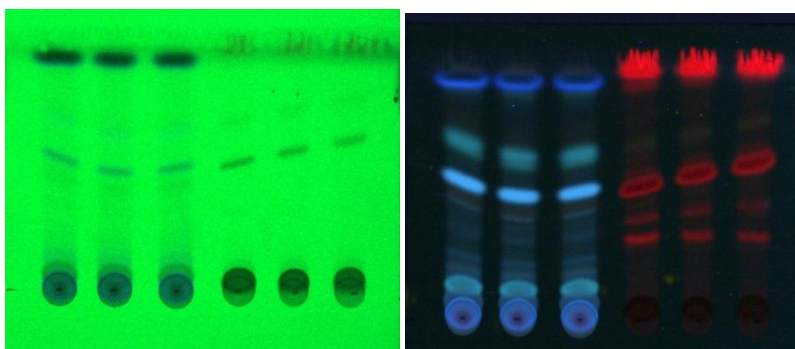


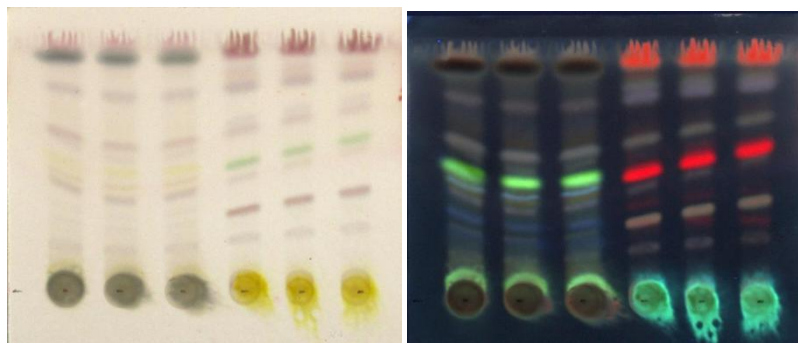




**Gambar.** Kombinasi ekstrak benalu belimbing (EBB) dengan ekstrak bawang sabrang (EBS) memberikan efek sinergis sangat kuat sampai antagonis sangat kuat terhadap penghambatan pertumbuhan sel HeLa. uji kombinasi dilakukan dengan masing-masing 4 (empat) seri konsentrasi dibawah konsentrasi IC<sub>50</sub>, untuk EBB dan EBS. Combination Index, < 0.1 sinergis sangat kuat, 0.1-0.3 sinergis kuat, 0.3-0.7 sinergis, 0.7-0.9 sinergis ringan-sedang, 0.9-1.1 antagonis ringan-sedang, 1.45-3.3 antagonis, > antagonis kuat-sangat kuat.

#### 4.5 Profil Thin Layer Chromatography Senyawa Aktif pada ekstrak benalu belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*) dan ekstrak bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*)





**Gambar 4.2** Kromatogram hasil KLT Senyawa Aktif pada ekstrak benalu belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*) dan ekstrak bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*). dengan fase diam silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak Chloroform: Metanol (9:1) setelah dieluasi dan dilihat di bawah lampu UV 254 nm (a); di bawah lampu UV 366 nm (b); setelah disemprot dengan penampak noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% dan dipanaskan pada 105°C (c); setelah disemprot, dipanaskan dan dilihat di bawah lampu UV 366 nm .

## BAB V

### KESIMPULAN

Berdasarkan uraian data tersebut di atas maka dapat disimpulkan bahwa:

1. ekstrak etanolik dari tanaman bawang sabrang (*Eleutherine bulbosa*) mampu menghambat secara selektif pertumbuhan sel kanker serviks HeLa dengan nilai pada  $IC_{50}$  : 40.36  $\mu\text{g/ml}$ , nilai SI (*selectivity Index*) sebesar **4.06**
2. ekstrak etanolik dari tanaman benalu belimbing (*Macrosolen cochinchensis*) mampu menghambat secara selektif pertumbuhan sel kanker serviks HeLa  $IC_{50}$  : 217.72  $\mu\text{g/ml}$ , nilai (*selectivity Index*) sebesar **5.77**
3. kombinasi ekstrak etanolik bawang sabrang(*Eleutherine bulbosa*) dan benalu belimbing (*Macrosolen cochinchensis*) dalam menghambat pertumbuhan sel kanker serviks Hela memberikan efek **sinergis sangat kuat** pada dosis EBS 22.62 $\mu\text{g/ml}$  : EBB 23 $\mu\text{g/ml}$ . **Sinergis kuat** : EBB 23 $\mu\text{g/ml}$  : EBS 11.31 $\mu\text{g/ml}$  ; EBB 23 $\mu\text{g/ml}$ : EBS 16.96 $\mu\text{g/ml}$ . **Sinergis** : EBB 23  $\mu\text{g/ml}$ : EBS 5.65  $\mu\text{g/ml}$  ; EBB 93.2  $\mu\text{g/ml}$  ; EBS 11.31  $\mu\text{g/ml}$
4. berdasarkan profil Kromatografi Lapis Tipis dengan menggunakan scanner di dapatkan hasil bahwa senyawa yanterdapat pada ekstrak adalah senyawa terpenoid, alkaloid dan flavonoid

## DAFTAR PUSTAKA

- Alia mustika Nur. Kapasitas Antioksidan Bawang Dayak Dalam Bentuk Segar, Simplisia Dan Kripik Pada Pelarut Non Polas, Semi Polar Dan Polar. *Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor*; 2011.
- Attesahin A., Karahan I., Turk G., Gur S., Yilmaz S., Ceribasi A.O. 2006. *Protective. Role of Lycopene on Cisplatin-Induced Changes in Sperm Characteristics,. Testicular Damage, and Oxidative Stress in Rats.*
- Bosch, et.al., 2001. *Gangguan Sistem Reproduksi Perempuan. In: Hartanto, H., et al, eds. Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit. Edisi 6.* Jakarta: EGC, 1294-1296.
- Bray *et al.* 2012. Global Cancer Transitions According to the human Development Index (2008-2013): a Population-Based Study. *The Lancet* DOI:10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
- Conze, D., Weiss,L., Regen, P.S., Bushan, A., Weaver, D., Johnson, P., & Rincond, M., 2001. Autocrine Production of Interleucin-6 causes multidrug resistance in breast cancer cell, *Cancer Res, volume 61.*
- Departemen Kesehatan RI.1989. *Materia Medika Indonesia Jilid V.* Jakarta: Departemen Kesehatan RI
- Firdaus R. *Telaah Kandungan Kimia Ekstrak Metanol Umbi Bawang Tiwai.* Skripsi. Institut Teknologi Bandung . Bandung 2006.
- Fitri *et al.* 2014. Effects of Inhibition Cell Cycle and Apoptosis of Sebrang Onion Extract (*Eletheurine bulbosa* (Mill.)Urb.) on Breast Cancer Cell. *International journal of PharmTech research. Volume 6.*
- Gembong, Tjitrosoepomo. 2005. *Morfologi Tumbuhan.* Gadjah Mada University. Yogyakarta.
- Hacker N.F.2000. *Principle of cancer Therapy, dalam Essentials of obstetrics and Gynecology, Edisi 2,* (pp 613-624). USA: Saunders w.b company.

- Hara H, Maruyama N, Yamashita S dkk, A Novel New Napthoquinones From The Bulb Of Eleutherin Americana. *Chem phram bull*; 1997.45:1724-1716
- Iffesan BOT, siringvongtikum s, Hutadilok towatana, voravontikunchai. 2009. Evaluation the of ability of eleutherin americana crude extract as a natural food additive in cooked pork . *J food Sci*. 74. M352-M357.DOI .10/1111.
- Igney F.H., & Krammer P.H., 2002. Review : death and antideath: tumor resistance to apoptosis, *Nature Review: Cancer*, volume 2.
- Indran, R.I., Tufo, G., Pervaiz, s., Brenner, C., 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta. Elsevier*, 1807
- Moitra, Karobi. 2015. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *Biomed Research International And Hindawi Publishing Corporation. Volume 2015*.
- Rahman *et al.* 2012. *Macrosolen cochiniensis* (Lour): Anti-Nociceptive and Antioxidant Activity. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine. Elsevier. Volume 203*
- Sasmito, Darsono, Zainul, K., Matrozi, 2001, Kemampuan Fraksi Air dan Fraksi Etil Asetat Daun Benalu Petai *Dendrophloe petandra* (L) Miq Melarutkan Batu Ginjal Galsium In Vitro yang Diuji dengan Metode Aktivasi Neutron Cepat, *Majalah Farmasi Indonesia*, 12 (14) 186-193.
- Thomas, A.N.S., 1999, *Tanaman Obat Tradisional I*, Penerbit Kanisius, Yogyakarta, 99-101, 124-125.
- Van Steenis, .C.G.G.J., 1975, *Flora Voor de Scholen in Indonesie*, diterjemahkan oleh Sorjowinoto, M., edisi ke-6, PT Pradnya Paramitha, Jakarta.

- WHO. 2012. *Human Papillomavirus (HPV) and Cervical Cancer*.  
<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/> (diakses tanggal 19 Februari 2016)
- Wiknjosastro, H. 1997. *Kanker dalam Ilmu Kebidanan*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.
- Wyllie A., Donahue V., Fischer B., Hill D., Keesey J. & Manzow S., 2000. *Cell Death Apop. Nec*. Roche Diagnostic Corporation.
- Yusni, M.A. 2008. *Perbedaan Pengaruh Pemberian Fraksi Etanolik Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia L. Merr.) dengan 5-Fluorouracil Terhadap Pengehambatan Pertumbuhan Galur Sel Karsinoma Kolon HT29 dan Ekspresi p53 Mutan*. Tugas Akhir. Program pendidikan dokter spesialis ilmu bedah fakultas kedokteran UNS.
- Zhi *et al.* 2013. Functionalized Graphene Oxide Mediated Adriamycin Delivery And Mir-21 Gene Silencing To Overcome Tumor Multidrug Resistance In Vitro. *PLOS ONE* volume 8.
- Saifudin, A; Viesa Rahayu; Hilwan Yuda Teruna. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soendani N. S. Yogyakarta: UGM Press.
- Vogel, A. I. 1978. *Textbook of Practical Organic Chemistry*. London: Longmans.
- Wonorahardjo, S. 2013. *Metode-metode Pemisahan Kimia, Sebuah Pengantar*. Jakarta: Akademia Permata.

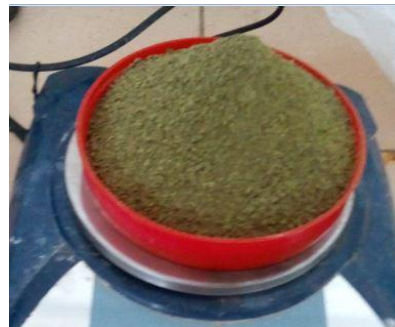
## Dokumentasi Penelitian

### 1. Preparasi Sampel

#### a. Umbi Bawang Sabrang (*Eleutherine bulbosa*)



#### b. Daun Benalu Belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*)



### 2. Ekstraksi Maserasi

#### a. Umbi Bawang Sabrang (*Eleutherine bulbosa*)



**b. Daun Benalu Belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*)**



**3. Fraksinasi**

**a. Umbi Bawang Sabrang (*Eleutherine bulbosa*)**



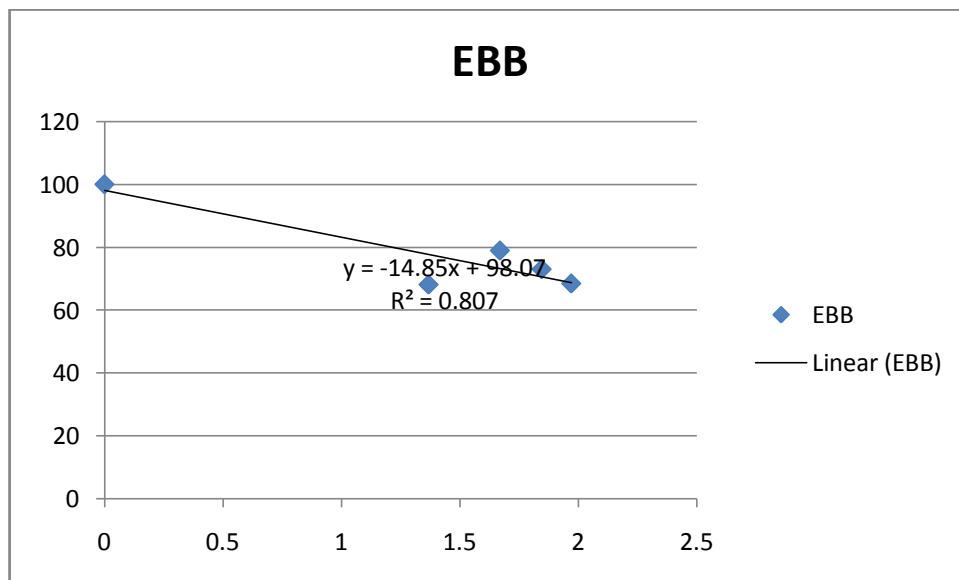
**b. Daun Benalu Belimbing (*Macrosolen cochinchinensis*)**

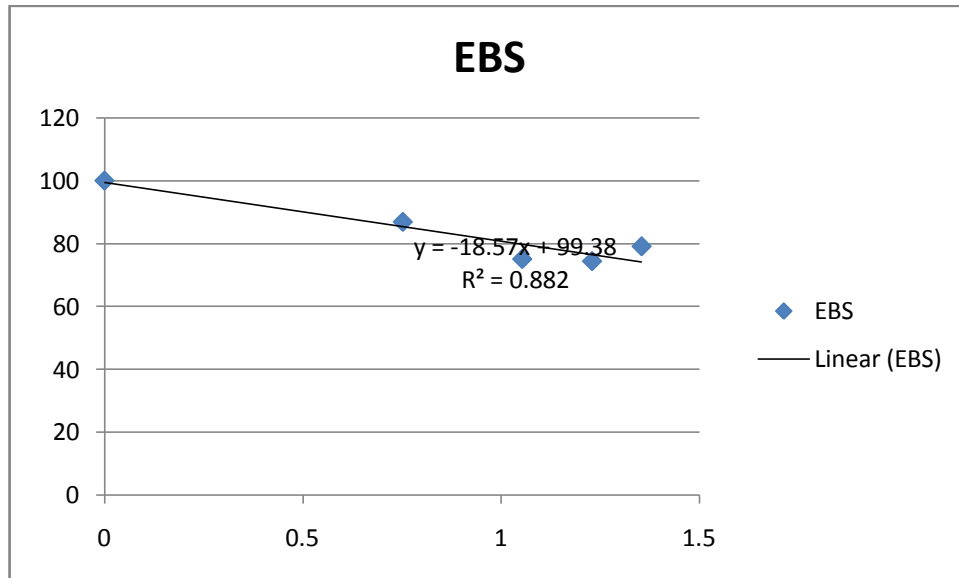


### Hasil Kombinasi EBS dan EBB

absorbansi tunggal							
ug/ml	EBS tunggal			ug/ml	EBB tunggal		
5.65375	0.632	0.72	0.707	23.32	0.56	0.545	0.566
11.3075	0.628	0.569	0.617	46.64	0.562	0.683	0.65
16.96125	0.581	0.612	0.607	69.96	0.594	0.582	0.596
22.616	0.627	0.641	0.63	93.28	0.57	0.539	0.569

cell viability tunggal									
ug/ml	EBS tunggal				rata-rata	ug/ml	EBB tunggal		
5.65375	79.01	91.75	89.86	86.87	23.32	68.581	66.409	69.450	68.147
11.3075	78.43	69.88	76.83	75.05	46.64	68.871	86.390	81.612	78.958
16.96125	71.62	76.11	75.39	74.37	69.96	73.504	71.766	73.793	73.021
22.616	78.28	80.31	78.72	79.10	93.28	70.029	65.541	69.884	68.485





EBS tunggal	y = -18.57x + 99.38			
	23	46	69.9	93.2
5.65	32.003	7.842	14.967	84.377
11.31	55.169	8.892	19.828	129.047
16.96	48.075	13.199	23.586	11.994
22.62	207.046	20.553	23.028	12.658

EBN tunggal	y = -14.85x + 98.07			
	23	46	69.9	93.2
5.65	62.235	10.722	24.059	209.188
11.31	122.966	12.547	34.201	355.866
16.96	103.523	20.561	42.490	18.240
22.62	642.742	35.771	41.237	19.511

absorbansi kombinasi													
	EBB 23.3				EBB 46.6				EBB 69.96				EBB 93.28
EBS	5.65	0.501	0.62	0.618	0.659	0.661	0.654	0.609	0.63	0.626	0.539	0.511	0.527
ug/ml	11.31	0.486	0.544	0.618	0.638	0.645	0.67	0.609	0.6	0.615	0.524	0.488	0.494
	16.96	0.477	0.621	0.573	0.641	0.631	0.615	0.574	0.62	0.601	0.652	0.632	0.619
	22.62	0.425	0.499	0.503	0.607	0.602	0.604	0.564	0.62	0.613	0.637	0.643	0.614

cell viability kombinasi													
	EBB 23.3				EBB 46.6				EBB 69.96				EBB 93.28
EBS	5.65	60.04	77.27	76.98	82.92	83.20	82.19	75.68	78.86	78.14	65.54	61.49	63.80
ug/ml	11.31	57.87	66.26	76.98	79.87	80.89	84.51	75.68	73.65	76.54	63.37	58.16	59.03

16.96	56.56	77.41	70.46	80.31	78.86	76.54	70.61	76.54	74.52	81.90	79.01	77.12
22.62	49.03	59.75	60.33	75.39	74.66	74.95	69.16	76.83	76.25	79.73	80.60	76.40

---